

Novel amphiphilic nucleic acid conjugates

Patent Number: ☐ US4904582
Publication date: 1990-02-27
Inventor(s): TULLIS RICHARD H (US)
Applicant(s): SYNTHETIC GENETICS (US)
Requested Patent: JP3500530T
Application Number: US19870061874 19870611
Priority Number(s): US19870061874 19870611
IPC Classification: C07H15/12; C12Q1/68; G01N33/566
EC Classification: A61K47/48H4P, C07H21/00F
Equivalents: ☐ EP0321548 (WO8809810), ☐ WO8809810

Abstract

Novel oligonucleotide conjugates are provided, where oligonucleotides are joined through a linking arm to a hydrophobic moiety. The resulting conjugates are more efficient in membrane transport, so as to be capable of crossing the membrane and effectively modulating a transcriptional system. In this way, the compositions can be used in vitro and in vivo, for studying cellular processes, protecting mammalian hosts from pathogens, and the like.

Data supplied from the esp@cenet database - I2

⑬ 公表 平成3年(1991)2月7日

⑭ Int. Cl.⁸ 識別記号 庁内整理番号 審査請求 未請求
C 07 H 21/04 Z 7822-4C 予備審査請求 未請求 部門(区分) 3(2)
8717-4B C 12 N 15/00 A
6807-4B 5/00 B※

(全 15 頁)

⑯ 発明の名称 新規な両親媒性核酸接合体

⑰ 特 願 昭63-505633

⑱ 翻訳文提出日 平1(1989)2月13日

⑲ 出 願 昭63(1988)6月11日

⑳ 国際出願 PCT/US88/02009

㉑ 国際公開番号 WO88/09810

㉒ 国際公開日 昭63(1988)12月15日

優先権主張 ㉓ 1987年6月11日 ㉔ 米国(US) ㉕ 061,874

⑳ 発 明 者 テューリス, リチャード エイ アメリカ合衆国, カリフォルニア 92024, リューカディア, サク
チ。 ソニー ストリート 1320

㉑ 出 願 人 シンセティック ジエネティク アメリカ合衆国, カリフォルニア 92121, サンディエゴ, スー
ス イー, ローゼル ストリート 10457

㉒ 代 理 人 弁理士 青木 朗 外4名

㉓ 指 定 国 AT(広域特許), BE(広域特許), CH(広域特許), DE(広域特許), FR(広域特許), GB(広域特許), IT
(広域特許), JP, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域特許)

最終頁に続く

特許(内容に変更なし)

請 求 の 範 囲

1. 細胞中でのメッセンジャーRNAの成熟及び翻訳を阻害する方法であって、

該細胞を、該細胞の転写生成物に相互的なオリゴヌクレオチド配列及び両親媒性分子を得るために該オリゴヌクレオチド配列に共有結合により連結された基を含んで成る組成物を接触せしめ、これにより該組成物を細胞内に移行せしめて前記転写生成物の成熟及び/又は翻訳の阻害を生じさせる、ことを含んでなる方法。

2. 前記細胞が培養されたものであり、そして前記組成物が栄養培地に導入される、請求項1に記載の方法。

3. 前記オリゴヌクレオチドが約6〜30ヌクレオチドから成るものである、請求項1に記載の方法。

4. 前記オリゴヌクレオチドの少なくとも1つがリン成分としてホスフェートを有する、請求項3に記載の方法。

5. 前記オリゴヌクレオチドの少なくとも1つがリン成分として1〜3個の炭素原子のアルキル基を有するホスホネートを有する、請求項3に記載の方法。

6. 前記基が疎水性芳香族基である、請求項1に記載の方法。

7. 前記芳香族基がトリチル基である、請求項7に記載の方法。

8. 前記芳香族基がフルオレセイン基である、請求項7に記載の方法。

9. 前記基がポリアルキレンオキシ基であり、ここで該アルキレンは2〜10個の炭素原子から成るものである、請求項1に記載の方法。

10. 前記ポリアルキレンオキシ基が約6〜200単位から成るものである、請求項9に記載の方法。

11. 細胞の転写生成物に相補的なオリゴヌクレオチド配列及び両親媒性を得るために該オリゴヌクレオチドに共有結合された両親媒性又は疎水性基を含んで成る組成物を含む細胞。

12. 前記細胞が培養細胞である、請求項11に記載の細胞。

13. 細胞の転写生成物に相補的な少なくとも6個のヌクレオチドから成るオリゴヌクレオチド配列；

アルキレンが2〜10個の炭素原子を有するポリアルキレンオキシ基を含んで成る両親媒性基；並びに

前記オリゴヌクレオチド配列及び前記両親媒性基に共有結合した、少なくとも1個の炭素原子を有するリンカー；を含んで成る組成物。

14. 前記ヌクレオチドが6〜30ヌクレオチドから成るものである、請求項13に記載の組成物。

15. 前記オリゴヌクレオチドの少なくとも1つがリン成分としてホスフェートを有する、請求項13に記載の組成物。

16. 前記オリゴヌクレオチドの少なくとも1つがリン成分として1〜3個の炭素原子を有するアルキル基を伴うホスホネートを有する、請求項13に記載の組成物。

17. 前記連結基が、アミノ、キノン、チオエーテル又はアミド基の少なくとも1つを含む、請求項13に記載の組成物。

18. 前記オリゴヌクレオチド配列が少なくとも部分的に非コード配列に相補的である、請求項13に記載の組成物。

19. 前記オリゴヌクレオチド配列が少なくとも部分的にコード配列に相補的である、請求項13に記載の組成物。

特許(内容に変更なし) 明 細 書

新規な両親媒性核酸複合体

摘 要

技術分野

この発明は、発現を抑制するための、溶解度調節成分に結合した特異的ポリヌクレオチド結合ポリマーに関する。

背景技術

細胞内発現の調節を可能とする試薬への興味と必要性が増しつつあるが、この試薬は、遺伝子に関連した様々な問題を解決する上で、至上的可能性をもつことになろう。そういった試薬、特に相補性核酸試薬は、ウイルス本来の遺伝子の発現を抑制する抗ウイルス剤として使用できよう。また、これらは、抗生物質としても作用し、ガン細胞の増殖率を下げたり、ガン全体の増殖を抑制する可能性もある。これら試薬は、細胞内で未知の順序によって転写産物に結合し、特定の構造遺伝子の発現を抑制することになろう。

この可能性に関して相当の関心を持たれ、多くの培養実験によれば、この手法はかなり有望視されることが分かってきた。しかし、従来用いられていた数々の手法には多くの欠点もある。治療用として有用な薬剤とするためには、この試薬は、全身投与量を比較的低くできるように、低温度で有効性

を発揮せねばならない。次に、試薬は、比較的安定であって、様々なヌクレアーゼによる分解に抵抗性を示す必要がある。第三に、この試薬は、長いインキュベーション期間を回避するように、一度細胞質に取り込まれたら迅速に拡散する必要がある。その相補的配列に極めて特異的に結合しなければならない。第四に、試薬は、膜透過性があり、血中で濃度が上昇しないように、低温度で有効性を示さなければならない。最後に、宿主の哺乳類への副作用が最小限であって、免疫反応を出来る限り押えられるオリゴヌクレオチド試薬を提供する必要がある。こういった種々の基準は、様々な程度で妥協が必要であるが、今まで製られた試薬は、一般的には遙かに及ばなかった。

関連文献

単一塩基のミスマッチへの高い感受性を保持し、最大の選択性が得られるような、比較的短鎖のプロープの使用は、以下の論文に示唆されている。Szostakら、Methods Enzymol. (1979) 68:419-429; Wu, Nature New Biology (1972) 236:198; Itakura および Riggs, Science (1980) 209:1401; Noyes, J. Biol. Chem. (1979) 254: 7472-7475; Noyes ラット, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979) 76:1770-1774; Agarwalら、J. Biol. Chem. (1981) 256:1023-1028; Tullisら、Biochem. Biophys. Res. Comm. (1980) 93:941; Orkinら、J. Clin. Invest. (1983) 71:775; Connorら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1983) 80:278; Piratouら、

New Eng. J. Med. (1983) 309:284-287; Wallaceら、Gene (1981) 16:21.

ウイルスの複製を抑制する、特異的な核酸配列の使用に関する論文が、多数みられる。例えば、Zamecnik および Stephenson, Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1978) 75:280-284; Tullisら、J. Cellular Biochem. Suppl. (1984) 8A: 5B (要約); Kawasaki, Nucl. Acids. Res. (1985) 13:4991; Walderら、Science (1986) 233:569-571; Zamecnikら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83:4143-4146.

各種トリエステルおよびメチルホスホン酸などの修飾核酸も、発現の抑制に有効と見られてきた。Millerら、Biochemistry (1974) 13:4887-4895; Barrettら、上記の論文 (1974) 13:4897-4906; Millerら、上記の論文 (1977) 16:1988-1997; Millerら、Biochemistry (1985a, b) 24:6132および6134; Smithら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1986) 83:2787-91; Agriaら、Biochemistry (1986) 25:6268-6275; Millerら、Biochemistry (1986) 25:5092-5097.

相補的配列への結合性を高める修飾型核酸配列は、以下の論文に見られる。Vlassovら、Adv. Eng. Reg. (1986):301-320; Summerton, J. Theor. Biol. (1979) 78:77-99; Knorre (1986) Adv. Eng. Reg. 1986:277-300.

ポリエチレングリコールに結合するタンパク質の免疫原性の低下については、以下の文献に記載されている。Tomasi および Fallow, W086/04145 (PCT/US85/02572); Abuchowskiら、Cancer Biochem. Biophys. (1984) 7:175-185。米国特許第

4,511,713 号、および米国特許第4,587,044 号も参照のこと。

発明の要約

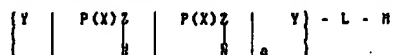
細胞内発現を調節するために、注目配列に相補的な比較的短い核酸配列、リンカー、および最終産物に両親媒性、通常では親水性より疎水性（親水基によって両親媒性が生じるような）を付与する基を含めて、新規な核酸複合体がいろいろと提供されている。核酸部分には、通常もしくは異常な塩基、リン酸基もしくは修飾リン酸基、または通常の塩基以外の塩基が含まれることがあり、そこでは、修飾によって、対象配列への結合が妨げられない。そういった組成物は、新生物細胞、ウイルス感染細胞中のウイルスタンパク質、ヒトならびに動物の病原体の必須タンパク質（核酸もしくは複製）などで、mRNAの成熟および／または特定の相違遺伝子の発現を抑制するために用いられる。

特定の組成物の説明

この発明は、細胞内でのmRNAの成熟および／または相違遺伝子の発現を抑制する、新規な核酸複合体を提供することを目的とする。各組成物には、比較的短いオリゴヌクレオチド配列、リンカー、および両親媒性産物を形成するようにHLB（親水性・親油性バランス）を喪失する基が含まれている。生成物の両親媒性は、細胞膜を介しての複合体の輸送に寄与し、核酸配列の水溶性の増大（例えば、長鎖ホスホン酸メチルの水溶性を増大させるような両親媒性基の使用）、

およびエキソヌクレアーゼによる消化に対する正容核酸の安定性亢進などの利点がさらに得られる。

この発明の化合物は、ほとんどが以下の一般式を有する。



Xは一般に、電子対、カルコゲン（酸素もしくはイオウ）、またはアミノ、特にNHを示す。

Zは、天然型もしくは合成の糖基基を示し、それらは五炭糖の2', 3'ならびに5'水酸基の2カ所および六炭糖での相当部位で結合したものである。一般に、Zは、リボースもしくはデオキシリボース、またはその他、アラビノース、キシロース、グルコースもしくはガラクトースなどの五炭糖もしくは六炭糖（特に五炭糖）が適している。

Nは、天然のプリンもしくはピリミジンと結合やハイブリッド形成可能な天然もしくは非天然塩基（プリンもしくはピリミジン）のいかなるものでもよく、これらプリンおよびピリミジンには、アデニン、シトシン、チミジン、グアニジンのような天然型デオキシリボースヌクレオシドのプリンおよびピリミジン、またはウラシル、イノシンのような他のプリンおよびピリミジンなどが挙げられる。

Lは、少なくとも1原子の多機能基に由来するリンカーであって、水素を除いた約60個以下の原子、一般には約30個までの炭素原子を有する、水素を除いた約30個以下の原子、通常では20個以下の炭素原子、および約10個までのヘテロ原子、より一般には約6個までのヘテロ原子、特に

aは、少なくとも5、そして約50以下、通常では約35以下である。

リン成分には、ホスフェート、ホスホラミデート、ホスホルジアミデート、ホスホロチオエート、ホスホロチオネート、ホスホロチオレート、ホスホルアミドチオレート、ホスホネート、ホスホルイミデートなどが含まれる。

プリンおよびピリミジンには、チミジン、ウラシル、シトシン、6-メチルウラシル、4, 6-ジヒドロキシピリミジン、イソシトシン、ヒポキサンチン、キサンチン、アデノシン、グアノシンなどが含まれる。

Zには、リボース、アラビノース、キシロース、またはそれらのα-デオキシ糖基が挙げられる。その他のヌクレオシドとして、ヘキソースを利用することができる。

多様なリンカーを、末梢ヌクレオチドの性質、リンカー基がオリゴヌクレオチドの合成中に存在するか否かで選択される官能基、溶解性調節成分上に存在する官能基に応じて利用することができる。多数のリンカーが市販されていて、多官能化合物を連結するために用いられてきた。リンカーには以下のようなものが含まれる。
 $-OCH_2CH_2NHC(O)(CH_2)_nCONH-$;
 $-OCH_2CH_2NH-X-(CH_2)_nNH-$;
 $-O-P(O)(OH)NHCH(CH_2)_nCONH-$;
 $-OCH_2CH_2NHCOS-$;
 $-NH(CH_2)_nNH-$;
 $O(CH_2)_nO-$;
 $O(CH_2CH_2NH)_n-$;
 $-NH(CH_2)_nSYN-$;
 $-CO(CH_2)_nCO-$;
 $-SCH_2CH_2CO-$;
 $-O(CH_2CH_2NH)_n-$;
 $-NH(CH_2)_nCO-$;
 $-SCH_2CH_2CO-$;
 $-CO\phi NYS-$;
 $-N(CH_2CH_2)_nCH_2NH-$;
 $-O(CO)NH(CH_2)_nNH-$;
 通常では約500 ないし2000ダルトンの

カルコゲン、酸素、リンなど、非オキソカルボニル基（カルボキシカルボニル基）、オキソカルボニル基（アルデヒドもしくはケトン）、またはそれらのイオウもしくは窒素含有原子団、例えば、チオノ基、チオ基、イミジル基など、およびジスルフィド基、アミノ基、ジアゾ基、ヒドラジノ基、オキシミノ基など、ホスフェート、ホスホネートを示す。

Mは、この分子に両親媒性、特にホスフェートに関して疎水性、ホスホネート（これらの炭素：ヘテロ原子の比は、少なくとも2:1、通常では少なくとも3:1、さらに20:1を超えるまで）に関して両親媒性を付与する溶解性調節成分であって、少なくとも6個の炭素原子そして約30個以下の炭素原子を含む炭化水素、ポリオキシ化合物（アルキレンオキシ化合物）を含むことがあり、これらの化合物中では、炭素原子は約2ないし10個、通常では2ないし6個、好ましくは2ないし3個の炭素原子と結合し、少なくとも約6単位、通常では約200 アルキレンオキシ単位以下、より一般には約100 単位以下、好ましくは約50 単位以下であろう。

一方のYはLに対する結合子であって、他方のYは一箇のオキシ、チオ、アミノ、糖もしくはそれらの置換型官能基、または約20炭素原子未満のアルキル基、通常では約6炭素原子未満、Pに結合した場合は、水素1ないし30原子、通常では1ないし12原子のヒドロカルビル基もしくはアクリル基、または1ないし4個のヘテロ原子団（Zに結合する場合、オキシ、チオもしくはアミノ）を有する置換型ヒドロカルビル基もしくはアクリル基である。

ポリグイシン、ポリリジン、ポリメチオニンなどのアミノ酸のホモおよびコポリマー（電荷の有無に拘らない）。式中、Xは2, 5-キノンジルを示し、Yは、スクシニミジルを形成する（3-スクシンジオイル）を示し、nは、通常では2ないし20の範囲、より一般には2ないし12であって、mは、1ないし10、通常では1ないし6である。

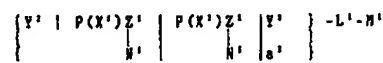
親油性／両親媒性基には、様々な原子団があり、脂肪族、芳香族、脂環式、複素環式化合物、またはこれらの組み合わせが挙げられる。それらの化合物は、炭素原子2個あたりヘテロ原子1個または0個を有し、電荷の有無に拘らない、通常では炭素数が少なくとも6、より一般には12、および約500以下、通常では約200以下から成る。これらには以下のものが含まれる。炭素数が少なくとも6、そして約30未満、通常では約24以下から成るアルキル基であって、炭素数が少なくとも約6、通常では少なくとも約12、そして約24未満からなる脂肪酸、脂肪酸の炭素数が一般には約12ないし24個の範囲にあるグリセリド（それには、一般に2もしくは3位または両位置で1ないし2個の脂肪酸が付いている）、1ないし4個の環を有する芳香族化合物、アルキレンの炭素数が2ないし10、一般には2ないし6、より一般には2ないし3である、モノもしくはポリ環式、融合もしくは非融合のポリアルキレングリコール、通常では少なくとも約6単位、より一般には少なくとも約10単位、そして一般には約500単位未満、より一般には少なくとも約200単位未満、好ましくは約100単位未満であって、アルキレングリコールがホモ

ポリマーまたはコポリマーであり得るもの；アルキル基の炭素数が少なくとも約6、一般には少なくとも約10、および約24以下、一般には約20以下のアルキルベンゾイル；アルキル基の炭素数が少なくとも約6、一般には少なくとも約12、および約24以下、一般には約20以下のアルキルホスフェートもしくはホスホネートなど。

溶解性調節成分は、生理的条件下で荷電しているかまたは非荷電（非荷電が好ましい）であって、通常では水素以外の原子10個の基あたり1電荷を有するものである。例えば、約40ないし50単位のポリエチレングリコール、エチレンとプロピレングリコールとのコポリマー、ポリエチレングリコールのラウリル酸エステル、トリフェニルメチル、ナフチルフェニルメチル、パルミテート、ジステアリルグリセリド、ジドデシルホスファチジル、コレステリル、アラキドニル、オクタデカニロキシ、テトラデシルチオなどの基が挙げられる。

可能性のある官能基には、オキソ、チオ、カルボニル基（オキソもしくは非オキソ）、シアノ、ハロ、ニトロ、脂肪族の不飽和基などが含まれる。

以下の一般式のオリゴヌクレオチド接合体が、特に興味深い。



X' は、窒素または酸素を示す。

Z' は、3' および 5' 位で置換されたりボースまたはデオ

キシリボースを示す。

1個のY' はL'への結合であり、そして他のY' は炭素原子数0〜3のヒドロキシ、アルキル、アルコキシ又はアミノ（置換されたアミノ、例えばアルキル、アシル等を含む）、又は5炭糖、特にリボース又はデオキシリボース（P及び水素への結合の場合）、アルキル、又は炭素原子数1〜10個、通常1〜6個のアシル、またはアルキル（Z'に結合する場合）である。

N' は天然プリン及びピリミジンにハイブリダイズすることができる任意のプリン又はピリミジンであるが、好ましくは天然プリン又はピリミジンである。

L' は、炭素数が少なくとも約20、そして約30以下、一般には約20以下のリンカーを示し、酸素、窒素ならびにイオウ、特にオキシ、アミノもしくはチオである0ないし10個、一般には1ないし6個のヘテロ原子を有する。

M' は、好ましくは少なくとも約20単位、そして約200単位以下、通常では約150単位以下のポリアルキレンオキシ基の溶解性調節成分であって、疎水性または両親媒性を示し、そのアルキレン基は、炭素数が2ないし3から成る。

a' は、少なくとも5、通常では少なくとも7、そして通常では約50以下、一般には約30以下、より一般には約10ないし30、好ましくは約13ないし30である。

この発明の組成物を調製する際、上記のオリゴヌクレオチドおよび溶解性調節成分は、通常では独立成分として存在し、リンカーアームによって結合可能である。オリゴヌクレオチド

は、任意の便利な合成法によって調製できる。組換え法は、ほとんど利用できないが、有用となる場合がある。ポリヌクレオチドを調製するための合成装置の各種市販品がApplied Biosystems Inc., Bioscience Inc., およびPharmacia など多数の会社から入手できる。トリエステル、ホスホラミディチイ、ホスホネートなどとしてブロックオリゴヌクレオチドを使用するために、数々の方法が知られており、環化法が用いられると、個々のヌクレオチドは連続して添加される。

合成の終了時点では、様々なプロトコルを使用できる。殆どの場合で、末端のブロック基を除去することができ、末端ヌクレオチドは、リンカーの添加によって修飾することができ、リンカーが最終のオリゴヌクレオチドに特異的となり得る。末端のブロック基がリンカーの全体または一部として作用し得る場合もある。また、オリゴヌクレオチドは担体から除いて、さらに操作することもでき、その際、特に担体に対するリンカーが疎水性の修飾域を結合するためのリンカーとして使用可能である。オリゴヌクレオチドの5' または3' 末端をさらに分画するための様々な方法が、Chu およびOrgel, DNA (1985) 4:327-331; ConnollyおよびRider, Nucl. Acids Res. (1985) 13:4485-4502に見られる。

官能基に応じて、アミン、エステル、無機ならびに有機の酸素ならびにイオウエーテル、アミンなどを産出するために、様々な反応が利用できる。カルボキシル基と作用させる場合、カルボニルジイミダゾール、カルボジイミド、スクシンイミジルエステル、p-ニトロフェニルエステルなどの様々な活

性基を使用できる。

数々の活性な官能基、例えば、イソシアネート、ジアゾ基、塩化イミノ、イミノエステル、無水物、ハロゲン化スルフィニル、イソチオシアネート、塩化スルホニルなどを使用できる。非核酸塩成分核酸成分に結合する様々な反応を実施するための条件は、Chu および Orgel, DNA (1985) 4:327-331; Smithら, Nucl. Acids. Res. (1985) 13:2399-2412に見られる。

リンカーのオリゴヌクレオチドへの添加の前後、またはそれと同時に、溶解性調節成分をリンカーに添加することができる。ほとんどの場合、溶解性調節成分は、オリゴヌクレオチドに対するリンカーの反応の後に添加する。リンカーへ溶解性調節成分を結合させるほうが望ましい場合もあり、その際、リンカーはオリゴヌクレオチドに結合し、オリゴヌクレオチドは支持体に結合する。すでに指摘したように、リンカーと溶解性調節成分との反応は、その際の特官能基、疎水性基の性質、要求される反応条件などとともに変化する。

ほとんどの場合、反応は、温和であって、極性溶媒、極性もしくは非極性の組み合わせ溶媒中で生じる。様々な溶媒を用いることができ、水、アセトニトリル、ジメチルホルムアミド、ジエチルエーテル、塩化メチレンなどが含まれる。反応温度は、ほとんど約-10ないし60℃の範囲である。通常では、複合体の成分間の反応が終了した後に、得られた産物を精製工程にかける。

精製法は、オリゴヌクレオチドが支持体に結合しているか

否かに応じて変えることができる。例えば、オリゴヌクレオチドが支持体に結合している場合では、オリゴヌクレオチドへのリンカーの添加後に、未反応鎖を分解することができ、その結果、得られた産物に夾雑物の入ることを防ぐことができる。そういった場合、オリゴヌクレオチドへのリンカーの結合は、合成支持体（例えば、固相アミノ酸）からの分解に耐えるために、十分安定でなければならない。オリゴヌクレオチドが支持体に結合していない場合、リンカーとの反応だけか、溶解性調節成分の中間体に対する複合体もしくは最終産物としての反応において、各中間体または最終産物は、電気泳動、薄層抽出、HPLC、クロマトグラフィーのような従来の技術によって精製することができる。続いて、精製産物は使用に備える。

この発明の生成物は、オリゴヌクレオチド配列が目的の配列に相補的となるようなものを選択する。目的の配列は、原核細胞もしくは真核細胞、ウイルス、正常もしくは新生物細胞中に存在することがある。これらの配列には、細菌の配列、プラスミドの配列、ウイルスの配列、染色体の配列、ミトコンドリアDNAの配列、色素体DNAの配列などが挙げられる。これらの配列には、コードタンパク質のためのオープンリーディングフレーム、リボソームRNA、snRNA、hnRNA、イントロン、非翻訳の5'末端ならびに3'末端領域、オープンリーディングフレームなどが含まれる。従って、この発明の配列は、RNA転写物の利用率の抑制、特定タンパク質の発現の抑制、リプレッサー発現の抑制による特定タンパク質

の発現の促進、ウイルスもしくは新生物細胞の増殖の抑制などに関与することができる。細胞の表現型の修飾、ウイルス、細菌、タンパク質、マイコプラズマ、クラミジアなどの病原体の増殖の抑制、または新生物細胞もしくは正常細胞の特定のクラスに関する罹病率を低下させるために、*in vitro*または*in vivo*で用いることができる。従って、この発明の組成物は、宿主への投与によって治療に、またはある種の病態ではこの発明の1つ以上の化合物を、細胞の天然遺伝子の転写および/または発現の抑制に使用することができる。この発明の組成物は、哺乳動物の宿主における様々な病原体からの保護に使用することができる。これら病原体には、腸内毒素細菌、肺炎球菌、淋菌など、シアルジア属、アメーバ属など、癌腫、肉腫、リンパ腫のような新生物細胞など、ヘルパー細胞、サブレッサー細胞、CTL、NK、ADCCのような特異的B細胞、特異的T細胞などが挙げられる。

この発明の配列は、種々の配列に対するこの発明の組成物の結合に関与した何らかの機序によって、転写産物の成熟およびタンパク質の発現を抑制し得るように選択することができる。これらの機序には、修飾の抑制、核膜を介した輸送の阻害、エキソヌクレアーゼによる分解などが含まれることがある。

この発明の配列は、増殖因子、リンホカイン、イムノグロブリン、T細胞レセプター部位、MHC抗原、DNAもしくはRNAポリメラーゼ、抗体耐性、重複薬剤耐性(mdr)、代謝過程でアミノ酸、核酸などの形成に関与する遺伝子、DHFRなど、およびオープンリーディングフレームと会合するイント

ロンまたは隣接配列を発現する配列のような配列に相補的であり得る。

以下の表に、この発明の組成物の別の応用を幾つか例示する。

合成DNAの治療面での応用

| 対象領域 | 特異的適用領域 |
|---------------------------------|---|
| 感染症 抗ウイルス剤(ヒト) 抗ウイルス剤(動物) | AIDS、ヘルペス、VSV、ニフトの感染、性気管支炎、ニフトの伝染性、肺炎ウイルス、薬剤耐性のプラスミド、E.coliマラリア病原体、眼病(トリパノソーマ類) |
| 癌 直接抗腫瘍剤 補助治療 | c-myc 癌遺伝子-白血病 その他の癌遺伝子 メソトレキセート耐性-白血病 薬剤耐性腫瘍-薬剤輸送 |
| 自己免疫疾患 T細胞レセプター | 慢性関節リウマチ 1型糖尿病 全身性硬化症 多発性硬化症 |
| 器官移植 | 腎-OTK 3細胞はGVHDを誘発 |

この発明の組成物は、組成物が*in vivo*または*in vitro*で使用されるか否に応じて、様々な方法で宿主に投与することができる。*in vitro*では、細胞質および核などの細胞内部へ膜を介しての輸送によって特定遺伝子の発現を調節するように、この組成物を栄養培地に添加することができる。この発明の組成物には、マイコプラズマの培養物中で哺乳動物細胞を保護する上で、数々の代謝過程(例えば、特定産物の産生)

要 約

に関する様々な発現、産生の様々な分布などの影響を評価するような特定の使用方法がある。この発明の組成物の細胞内輸送には特殊な添加物を必要としないが、この発明の組成物は、リポソームやその他の粒子中へのカプセル化によって修飾が可能であり、例えば、非イオン性界面活性剤、センダイウイルスなどの送達剤との結合に使用することもできる。

*in vitro*投与では、特定の目的に応じて、この発明の組成物を、注射、注入、錠剤などの様々な方法で投与できるので、組成物は、経口、経腸内、経腔内、皮下、病巣内などで投与することができる。組成物は、様々な方法で錠剤化が可能であって、炭酸水、水、リン酸緩衝生理食塩水、エタノール、水溶性エタノールなどの様々な生理学的に安全な溶媒に溶解することができる。またはリポソームもしくはアルブミン微粒子に錠剤化できる。

適用および投与方法が多岐であるので、特定の組成物を示唆することはできない。むしろ、各適用において、この発明の組成物は、従来方法での試験が可能であって、適切な組成を実験的に決定することができる。安定剤、緩衝液、添加剤、界面活性剤、賦形剤などを含めることもできる。これらの添加剤は従来からあり、通常では約5%未満、一様には1%未満で含有し、適宜、有効量とする。賦形剤については、活性物質の必要量に応じて99.9%を超えるまで含めることができる。

以下の実施例は、例示のために提供するものであって、限定するためではない。

合成の最終段階として、産物のオリゴヌクレオチド鎖から除去し、Amnolink(Applied Biosystems, Foster City, CA)を用いてアミノエタノールホスホラミダイトを5'水酸基に付加した。続いて、樹脂結合オリゴヌクレオチドは、脱保護し、ホスフェート型の結合に与えた方法を用いてカラムから除去した。

通常のホスホジエステルの場合、カラムからの除去および加水分解アンモニウム中55℃で一晩の加水分解が与えられた。

続いて、産物を50%エタノールから抽出し、逆相HPLC C-8シリカ充填カラムにより、5ないし50%のアセトニトリル/25mM酢酸アンモニウム(pH6.8)の溶出液で洗脱勾配をかけて精製した。必要に応じて、この物質は、20%アセトニトリル/25mM酢酸アンモニウム(pH6.5)を溶出液に用いて、Nucleogen DEAE 80-7 充填のイオン交換HPLCによって一層の精製を行うことができる。次に、回収された産物は、15%ポリアクリルアミドゲル電気泳動によってその特徴を調べた。この電気泳動は、Maxam Gilbert, Method of Enzymology (1980) 68:499-560 に記載された通りに実施した。仕上げ後のゲル中のオリゴヌクレオチドは、Stain-o-illを用いて視覚化した。このStain-o-illは、DNAメチルホスフェートまたはエチルトリエステルなどの非電荷ヌクレオチドには作用しなかった。

完全に脱保護して精製した産物は、続いて、適切なカップリング法を用いて適当なポリエチレングリコール担体に接

実施例1

Amnolink(アミノリンク)、ベンゾキノロンおよびビス(アミノヘキシル)ポリエチレングリコールを用いた、正常DNAのポリエチレングリコール担体の合成

アミダイト法によるDNAオリゴヌクレオチドの化学的合成

DNAの化学的合成は、市販のいかなるDNA合成装置により、従来のホスホラアミダイト法を若干変えて実施した。この方法は、Caruthersらが記載した手法(Beaucage および Caruthers, 欧州特許出願第82/102570号)の変法である。

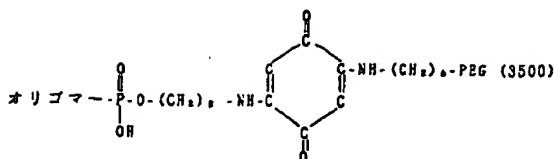
この方法では、無水アセトニトリルに溶解した0.1Mヌクレオチドホスホラアミダイトを等量の0.5Mテトラゾールと混合してから、コハク酸塩スプレーを介して対照の細穴ガラス支持体に結合した成長DNA鎖の5'水酸基末端のヌクレオチドにカップリングさせた(Matteucci および Caruthers, Tetrahedron Letters (1980)21:719-22)。ヌクレオチドの添加に、無水酢酸による未反応5'水酸基へのキャップ反応の付加、ヨウ素酸化、およびトリクロロ酢酸-塩化メチレン中での5'脱トリチル化を行った。続いて、樹脂結合オリゴマーを、無水アセトニトリル中での徹底した洗浄によって洗脱させ、この工程を繰り返した。この方法を用いた正常の周期は、98%を超える結合効率で12分であった(トリチル基の阻害によって判定)。

化する。ベンゾキノロン、カルボジイミド、SHCC(スクシンイミジル4-(N-マレイミドメチル)-シクロヘキサノン-1-カルボキシレート)、SPDP(N-スクシンイミジル3-(2-ビリジルジチオ)プロピオネート、カルボニルジメチル、Amnolink、ジスクシンイミジルスベリミダイトおよびフェニルイソチオシアネートを含有するいくつかの方法を用いることができる。

ベンゾキノロンへのリンカー鎖DNAのカップリング、およびビス(アミノヘキシル)ポリエチレングリコールへの架橋

最初の工程で、ビス(アミノヘキシル)ポリエチレングリコールを、0.1M炭酸ナトリウム溶液(pH8.5)に溶解したベンゾキノロンのモル比で100ないし1000倍過剰量と反応させる。室温で1時間後、過剰な未反応ベンゾキノロンをセファデックスG-25のカラムクロマトグラフィーで除去する。続いて、活性化されたポリエチレングリコールを0.1M炭酸ナトリウム溶液に添加し、モル比10:1で反応性のアミンリンカー鎖を含むDNAオリゴマーと反応させ、反応を完了させた。反応(通常では一晩)の終了時、未反応オリゴマーをセファデックスG-100のゲル濾過によって除去し、複合体の特徴は、ポリアクリルアミドゲル電気泳動によって調べる(Maniatisら, Molecular cloning, A laboratory manual (1982) Cold Spring Harbor, NY 参照)。必要に応じて一層の精製を、イオン交換クロマトグラフィーおよびゲル電気泳動を用いて行うことができる。

これらの反応産物の構造式は以下のとおりである。

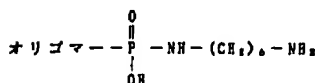


実施例2

Aminolink およびカルボニルジイミダゾール活性化ポリエチレングリコールを用いた、正常DNAのポリエチレングリコール担体の合成

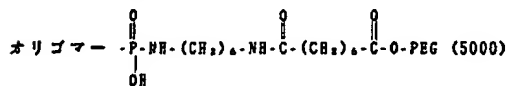
この実施例では、Aminolink オリゴスクレオチドを、実施例1での配座と同様に合成した。オリゴマーを支持体から除去し、アミノニア中で脱保護した後、溶液を真空蒸発乾燥し、1%炭酸ナトリウム溶液 (pH 8.5) で0.1 Mとしてから、G25 スパンカラム上で精製し、この物質をナトリウム塩に転化して低分子量の夾雑アミン含有物質を除去した。この溶液は、続いて、カルボニルジイミダゾール活性化ポリエチレングリコール (平均分子量=20,000) の0.2 M溶液とし、23℃で一晩反応させた。

未結合オリゴスクレオチドをセファデックスG100のゲル濾過によって除去した。このカラムクロマトグラフィーにおいて、複合体がカラムの非結合体積中に溶出し、遊離のオリゴスクレオチドおよび未結合ポリエチレングリコールは遅れて溶出した。続いて、この物質を真空中で乾燥し、複合体の特



そしてオリゴマーのアミノリンカーアームを次のようにしてNH-S-スクシニルモノメトキシオキシポリエチレングリコール (NH=5000)と結合させる。オリゴスクレオチドを、0.15M NaClを含む50mMリン酸ナトリウム緩衝液、pH 7.1中、リットル当たり100 μMの最終濃度に溶解する。この溶液に10倍モル過剰のSS-PEG(5000)を乾燥固体として添加し、溶解させ、そしてその反応混合物を25℃にて一晩インキュベートする。次いで生成物を、水中のSephadex G-100上でのゲル濾過クロマトグラフィーにより精製し、そしてポリアクリルアミドゲル電気泳動により特徴付ける。

最終生成物の精製は下記のものである：



例4

イミダゾール活性化カルボン酸エステルおよびビス-アミノアルキルポリエチレングリコールを用いた正常DNAのポリエチレングリコール担体の合成

この例では、例1において与えられた方法に従ってDNAを合成した。合成後、生成物は、該分子の5'-端からトリチルが遊離された状態で合成支持体上に保持された。ついで

微をポリアクリルアミドゲル電気泳動にて解析した (Maniatisら、(1982)上記文献)。

例3

ホスホロアミデートリンカーアミンおよびN-ヒドロキシスクシニイミジル活性化ポリエチレングリコールを用いた正常DNAのポリエチレングリコール担体の合成

この方法では、アミノリンクホスホロアミダイトのさらなる付加なしでトリチル基を除去すること以外は例1のようにして、DNAを合成する。ポリアクリルアミドゲル電気泳動による精製の後、精製法 (Millerら、Nucleic Acids Res. (1988) 11:6225-42; Maniatisら、(1982)、前掲; MaxamおよびGilbert、Proc. Nat'l Acad. Sci. USA (1980) 74:560-5) に従って、T4ポリヌクレオチドキナーゼの前向き反応により、生成DNAをリン酸化する。ラベル化されたオリゴマーは、DEAEクロマトグラフィーおよびC-18逆相カラム (例えばWaters C-18 SepPak) により、未反応のATPから分離され得る。試料を、分析用の20%ポリアクリルアミドゲル上で均一についてチェックする。

次いでリン酸化されたオリゴマーを、Chu およびOrgol, DNA (1985) 4:327-31の方法に従って、EDCカルボジイミド存在下で1-メチルイミダゾールおよびヘキサジアミンで処理する。この反応は、次の精製を有するホスホロアミデート結合を介してジアミンリンカーをオリゴスクレオチドに共有結合でつなぐ。

該固体材料を無水アセトニトリルで十分に洗滌し、そして乾燥アルゴンの流れのもとで風乾させる。プラスチックのシリンジを使って、無水アセトニトリル中に溶解された0.3 Mカルボニルジイミダゾール1 ccを、オリゴマーを結合した支持体を含む合成カラムを通して1時間に亘ってゆっくり押し出した。該カラム上の5'-カルボニルイミダゾール活性化オリゴマーを15 mlのアセトニトリルで洗って過剰の試薬を無くし、続いてアセトニトリル中0.1 Mのビス (アミノヘキシル) ポリエチレングリコール、水、アセトニトリルおよび塩化メチレンで16時間遊離して処理した。ポリエチレンオリゴマー複合体を、過剰水酸化アンモニウムで溶出し、そして55℃での5時間のインキュベーションにより同様に脱保護した。

次にその反応生成物を、10 mM Tris, pH 7.5を1分当たり0.5 mlにて流すTSN 640005M カラム上での高性能ゲル濾過クロマトグラフィー (HPLC)により精製する。アガロースゲル電気泳動によりさらに精製を行ってもよい。この方法により合成された最終複合体の精製は次のようである：



例5

イミダゾール活性化カルボン酸エステルおよびアミノリンカーを用いた正常DNAの最終アルカン担体の合成

この例では、例1において与えられた方法に従って、マウスのβ-グロブリンmRNAの開始領域に相約的な20ヌクレオ

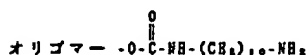
チドのDNAを合成した。生成物は、該分子の5'-端からトリチルが遊離された状態で合成支持体上に保持された。ついで固体材料を無水アセトニトリルで十分に洗浄し、そして脱塩アルゴンの流れのもとで風乾させる。プラスチックのシリンジを従って、無水アセトニトリル中に溶解された0.3 Mカルボニルジイミダゾール1 ccを、支持体に結合したオリゴマーを含む合成カラムを通して45分間ゆっくりと押し出した。該カラム上の5'-カルボニルジイミダゾール活性化オリゴマーを15 mlのアセトニトリルで洗って過剰の試薬を無くし、続いてアセトニトリル:水(10:1)中0.2 Mのデカンジアミンで30分間処理した。該カラム上の該物質をアセトニトリルおよび水で洗って未反応のデカンジアミンを無くし、加水酸化アンモニウムで溶出した。カラムからの溶出の後、オリゴマー接合体を含む水酸化アンモニウム溶液を封管バイアル中に入れそして55℃にて5時間インキュベートした。

次いで、生成物を50%水性エタノールから数回凍結乾燥し、そして逆相HPLC C-8シリカカラムにより、直接勾配において5~50%アセトニトリル/2.5 mM酢酸アンモニウム、pH 6.8で溶出して分離した。必要であれば、溶出液として20%アセトニトリル/2.5 mM酢酸アンモニウム、pH 6.5を従ったNucleogen DEAE 50-7 上でのイオン交換クロマトグラフィーにより、さらに分離してもよい。回収された生成物を、Maxam および Gilbert により $Meth. Enzymol.$ (1980) 68:499-560 中に記載されたようにして行う1.5%ポリアクリルアミドゲル中でのゲル電気泳動により特徴付けた。終了したゲル

中のオリゴヌクレオチドはStains-allを従って可視化された。

第一アミンの存在は、二つの方法により決定された。第一は、フルオレスカミンとの反応は第一アミンの存在に特徴的な蛍光生成物をもたらすが、アミンリンカーを欠く以外同じタイプの対照オリゴマーを同様に処理しても蛍光は全く観察されなかった。第二は、デカン接合体を100 μ lの0.1 M炭酸水素ナトリウム中に溶解し、これに1 ngのフルオレセインイソチオシアネート(FITC)を加えた。1時間のインキュベーション後、Sephadex G-25 スパンカラム上でのゲル濾過により、未反応のFITCを除去した。次いで生成物を、前述のようにポリアクリルアミドゲル電気泳動により分析し、そしてUV照明のもとで生成物の蛍光バンドを可視化した。Stains-allでの次なる染色により可視化されたオリゴマーと一致する単一の蛍光バンドが観察された。

この反応の生成物は、塩基基への粗かな暴露に対し安定であるアルキルカルバメートである。この方法により合成される最終接合体の構造は次のものである：



この方法により他のモノアミノアルキルおよびアリアル胺基体が製造され得る。形成されているこのシリーズの他の分子は、エチレンジアミンおよびヘキサレンジアミンを従った胺基体を包含する。長鎖の付加は、必要に応じて達成するために接合体の毒性を低くする必要とするかもしれない。また、反応時間を延長するならば、低収率を使うことができる。

例 6

イミダゾール活性化カルボキシエステル、ポリリジンリンカー、DSSおよびBIS-アミノアルキルポリエチレングリコールを従ったDNAのポリエチレングリコール接合体の合成

この例では、例1において与えられた方法に従って、マウスの β -グロブリンmRNAの開始領域に相対的な25ヌクレオチドDNAを合成する。合成後、合成支持体を80%酢酸で30分間処理し、該分子の5'-端からトリチルを除去した。ついで固体材料を無水アセトニトリルで徹底的に洗浄し、そして脱塩アルゴンの流れのもとで風乾させ、そして例4に記載したようにして0.3 Mカルボニルジイミダゾールで処理した。該カラム上の5'-カルボニルジイミダゾール活性化オリゴマーを15 mlのアセトニトリルで洗って過剰の試薬を無くし、そして0.1 Mリン酸ナトリウム、pH 8を含む50%アセトニトリル中に溶解された0.2 Mポリ-L-リジン (MW=1000) で室温にて16時間処理した。カラム上の物質を、水およびアセトニトリルで洗って塩および未反応のポリリジンを除去し、そして加水酸化アンモニウムでカラムから溶出した。カラムからの脱塩の後、オリゴマー接合体を含む水酸化アンモニウム溶液を、封管されたガラスのバイアル中に入れそして55℃にて5時間インキュベートした。

次いで、生成物を50%水性エタノールから数回凍結乾燥し、そして10 mMトリス緩衝液、pH 7.5 中、TSX G4000SH 上でのゲル濾過クロマトグラフィーにより分離した。第一アミ

ンの比率は、フルオレスカミンとの反応により決定された。ポリアミンリンカーを欠く対照のオリゴマーでは蛍光が全く観察されなかった。

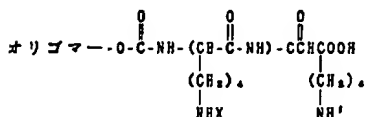
ポリアミン接合体を負に帯電させるために、該接合体をFITCで処理して該分子をラベルしそしてアミン上の正電荷を中和した。これは、該物質の一部を100 μ lの0.1 M炭酸水素ナトリウムに溶解し、これに1 ngのFITCを添加することにより達せられた。1時間のインキュベーションの後、未反応のFITCを、Sephadex G-25 スパンカラム上でのゲル濾過クロマトグラフィーにより除去した[Maniatis ら、(1982)、前掲]。次いでMaxam および Gilbert (1980) 前掲により記載されたように行うポリアクリルアミドゲル電気泳動によって生成物を分析した。Stains-allで可視化されたDNAと一致するブロードな蛍光バンドが観察された。

分子の5'-端に共有結合で連結されたポリリジンを含むオリゴマーを、次のようにビス-(アミノヘキシル)ポリエチレングリコール (MW=3500) と架橋させた。該ポリエチレンオリゴマーをまず0.1 M炭酸ナトリウム、3M NaCl に対して透析し、そしてCentricon 10装置(Amicon, Danvers, N.J.) を従って4 mg/mlの最終濃度に濃縮した。この濃縮液50 μ lに2.5 μ lのジスクシニミジルスベレート(DSS, 10 mg/ml DMSO 中) を添加し、そしてその混合物を室温で10分間インキュベートした。次いで未反応のDSSをSephadex G25上でのクロマトグラフィーにより直ぐに除去し、そしてCentricon 10 膜で濃縮した。濃縮液をビス-(アミノヘキシル)ポリエチレ

ングリコール中0.2 Mに作り、そして室温で一晩インキュベートして最終接合体を形成せしめた。前述のように操作してTSX G4000SW カラム上で精製を行った。

この接合体は次の一般式を有する：

1. 製品タイプ I



上式中、Xは普通Hであるが、少なくとも1つのXが-CO(CH₂)₄COHN-PEG...である。

使われる反応基またはポリエチレングリコールおよびポリリジンの分子数を変更することにより、色々な大きさの交換基のサイズおよび電荷を有するポリマー接合体を作製することが可能である。接合体のこれらの性質を改められることは、様々な用途における接合体の利用を企及することを可能にする。

例 7

DNAメチルホスホネートのポリエチレングリコール接合体の合成

DNAメチルホスホネート(MP)の化学合成は、Lettingerのホスホクロリゲイト法の変法を用いて行うことができる[Lettingerら、*J. Amer. Chem. Soc.* (1975) 97:3278; LettingerおよびLunsford、*J. Amer. Chem. Soc.* (1976) 98:3605-3661;

TanakaおよびLettinger、*Nucl. Acids Res.* (1982) 10:3249-60]。

この方法では、無水アセトニトリル2, 6-ルチジン中に溶解された塩基保護ヌクレオシドを化学置換のメチルジクロロホスフィンによりその5'で(in situ)活性化する。活性化されたヌクレオシドモノクロライドを、スクシネートスベーターを媒介して調節多孔質ガラスに結合した伸長DNA鎖のヌクレオチドの5'-水酸基に順次付加せしめる[Matteucci及びCaruthers、*Tetrahed. Lett.* (1980) 21:719-722]。各付加の後で、無水酢酸による未反応5'-水酸基のブロック、ヨウ素酸化、および3%トリクロロ酢酸-塩化メチレン中での5'-脱トリチル化を行う。

次いで、樹脂に結合したメチルホスホネートオリゴマーを無水アセトニトリル中での十分な洗浄により乾燥し、そしてこの工程を繰返した。この方法を使った通常のサイクル時間は23分であり、>82%の縮合効率を伴う(トリチル脱離により判断)。塩基での開裂の際に5'-末端のリン酸ジエステルを生じるシアノエチルホスホトリエステルとして最後の塩基を添加してもよい。この段階は、開裂の中間段階においてオリゴヌクレオチドを放射能ラベルし、ゲル電気泳動を使って生成物を精製しそして配列決定することを可能にする[Narangら、*Can. J. Biochem.* (1975) 53:392-394; Millerら、*Nucl. Acids Res.* (1983) 11:6225-6242]。

アミン-末端リンカーアームを次のように付加する。上記のようにトリチルを除去し、そして0.2 Mジメチルアミノピリジンを含む乾燥アセトニトリル中に溶解された0.2 M

Aminolink(Applied Biosystems, Foster City)で樹脂を5分間処理する。次いで上記のようにリンカーアームのオリゴヌクレオチドをヨウ素中で酸化しそしてアセトニトリル中で洗浄する。脱保護されたいずれの第一アミンも塩基-安定性アセトアミドに修飾されそのためさらなる反応に無効であるので、無水酢酸でのブロックは行わない。

合成の最後に、アミン末端のリンカーアームのメチルホスホネートオリゴマーを次のようにして脱保護する。DNAを含む樹脂をカラムから取り出し、ウォータージャケット付ラム中に入れ、1~2%のフェノール:エチレンジアミン(4:1)中40℃で10時間インキュベートする。フェノール:エチレンジアミン中でのインキュベーションの後で、メタノール、水、メタノール及び塩化メチレンを使って連続して樹脂を洗浄し、塩フェノール試薬及び塩基保護基を除く。真空での乾燥の後、塩基-脱保護された塩を、EDA:エタノール(1:1)または水酸化アンモニウムによる室温での留置な処理を使って支持体から開裂せしめる。

アミン-末端DNAメチルホスホネートの精製を次のように行う。該物質を50%水性エタノールから微画印結晶化し、そして逆相HPLC C-8カラムを通して直線勾配において5-50%アセトニトリル/25mM酢酸アンモニウム、pH6.8で溶出させて精製する。フルオレスカミン反応性により決定した、アミン-含有フラクションをプールし、真空中での乾燥により生成物を回収し、そして20%アセトニトリル/25mM酢酸アンモニウム、pH6.5で溶出させるNucleogen DEAE

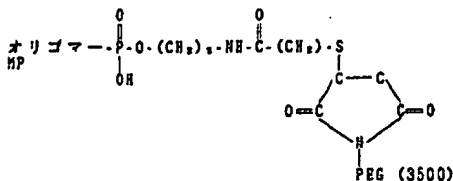
60-7上でのイオン交換クロマトグラフィーによりさらに精製する。

ついで精製された生成物を、ヘテロ二価性架橋剤SHCCおよびSATA(スクシンイミジルS-アセチルチオアセテート)を使って適当なポリエチレングリコール接合体に変換する。ヌクレオシド塩基と反応しそして修飾する他の試薬(例えばスルホニクロライド、グルタルアルデヒド又は酸無水物)は、まだ合成支持体と結合し十分にブロックされたオリゴヌクレオチドを用いて行わない限り、修飾されない。

5'-末端の反応性アミンリンカーアームを含むDNAメチルホスホネートをまずpH8.5(0.1 M炭酸ナトリウム)にて100~1000倍モル過剰のSATAと反応させる。室温で30分後、水中でのG-25カラムクロマトグラフィーにより余分な未反応のSATAを除去し、真空中で乾燥し、そして次の反応の用意ができるまで冷却保存する。0.1 Mリン酸緩衝液、pH6.9中での100~1000倍モル過剰のSHCCとの室温での1時間の処理により、ポリエチレングリコールをマレイミド接合体に変換する。Sephadex G-100上でのクロマトグラフィーにより過剰の架橋剤を除去し、該物質を真空中で乾燥し、そして次の反応の用意ができるまで冷却保存する。この物質は冷却保存すれば約1週間の間安定である。次いでSATA DNAメチルホスフェートを、0.1 Mリン酸緩衝液中に溶解された塩化ヒドロキシアミン(pHを7.2に調整)で1~2時間処理する。この処理は反応性のスルフィドリルを遊離させるために提供される。この生成物を10倍モル過剰のビス-(SHCCアミノヘ

キシル)と、オリゴマーを含む溶液に緩衝剤を加えて反応させる。

次いで複合体の精製を行う。非結合のオリゴヌクレオチドを、1.0 M トリス、pH 7.5 で溶出させる Sephadex G-100 上でのゲル濾過または TSK G4000SH 上での HPGPC により除去する。この手順の最終生成物の概略的構造は、次のものである。



例 8

ホスホアミジト法を用いる DNA アルキルトリエステルのポリエチレングリコール誘導体の合成

本例の化合物のトリエステルの合成は、Zon らの方法 (Gallo ら, *Nucl. Acid Res.* (1986) 14:7405~20; Suonens ら, *Nucl. Acid Res.* (1986) 14:7421~38) に従って行なわれる。この合成方法は他の例に記載されているようなエチルトリエステルのその場での製造に用いられる方法と同じである。完全にブロックされたジメトキシトリチルヌクレオシドはベンゼンから繰り返し抽出乾燥することによって乾燥され、無水アセトニトリル/2、5-ホルチンに溶解され、-70℃で同じ溶液中のクロロジソプロピルアミノエチルホスフィン

の塩溶液に添加される。生成物は、水抽出、真空乾燥およびシリカゲルクロマトグラフィーによって回収される。

DNA エチルトリエステル (ETE) の化学合成は、従来のホスホアミジト法をわずかに改良した方法を用いて行われる。この方法において、無水アセトニトリルに溶解したヌクレオシドホスホアミジドをテトラゾールと混合し、続いて 5'-ヒドロキシ末端ヌクレオシド結合に結合する。ヌクレオシド添加後、未反応 5'-ヒドロキシルと無水酢酸との結合、沃酸酸化、およびトリクロロ酢酸-塩化メチレン中での 5'-脱トリチル化を行なう。次いで樹脂結合オリゴマーを無水アセトニトリル中の大量洗浄によって乾燥し、このプロセスを繰り返す。この方法を用いる通常の周期時間は、96%以上の結合効率で (トリチル放出により判断)、17 分である。放射ラベルおよび精製を促進するためジエステルとして末端基を加えることが都合がよい。HPLC 精製を望む場合、5'-末端トリチル基が欠けているが、通常 5'-末端トリチルは除去され、例 1 に記載のアミノ結合法を用いる。

合成の最終において、完全にブロックした生成物を以下のようにして塩基-脱ブロックする。完全に保護された DNA を含む樹脂をカラムから取り出し、水-外液クロマトグラフカラムに入れる。次いでこの樹脂を 1~2 本のフェノール:エチレンジアミン (4:1) 中に 40℃で 10 時間インキュベートする。フェノール:エチレンジアミン中でのインキュベーションの終了時に、フェノールを含まない試薬で洗い、メタノール、水、メタノールおよび塩化メチレンを続けて洗い

て塩基保護基を分解する。室温で乾燥後、EDA:エタノール (1:1) を用いてまたは室温における水酸化アンモニウムによる簡単な処理を用いて支持体より塩基-脱ブロック化を再開する。

次いで、アミノリンク DNA エチルトリエステル生成物の精製を以下のようにして行なう。この物質をまず 50% メタノール水溶液より抽出乾燥し、5-50% アセトニトリル/2.5 M 酢酸ナトリウム、pH 6.8 の直線勾配で溶出する逆相 HPLC C-8 シリカカラムによって精製する。フルオレサミン反応性によって決定したアミン含有百分を定め、真空乾燥により生成物を回収し、さらに 2.5% アセトニトリル/2.5 M 酢酸アンモニウム、pH 6.5 で溶出する Nucleogen DEAE 60-7 のイオン交換 HPLC によって精製する。

生成物であるオリゴヌクレオチドは、前記のあらゆる方法によるポリエチレングリコールへの結合に相当である。我々の実験において、SHCC、SPDP、カルボニルイミダゾール、ジスクシンイミジルスベリミデートおよびフェニルイソシアネートを含む多くの方法が用いられた。

SHCC/SPDP 結合反応は以下のとおりである。結合アームグループを過剰の SPDP と結合させ、続いてジチオスレイトール (DTT) による還元、未反応 DTT 除去および過剰スルフィドによるビス (アミノヘキシル) ポリエチレングリコール (PEG) へあらかじめ結合した SHCC への架橋を行なう。チオエーテル結合の形成は急速であり、選択的であり、形成した結合は種々の条件に対し全く安定である。

DNA 含有アミン結合アームを pH 8.5 において (0.1 M 炭酸ナトリウム)、100~1000 倍モル過剰の SPDP と反応させる。室温で 1 時間後、G-25 カラムクロマトグラフィーで過剰の未反応試薬を除去し、ブルー SPDP 共役体を真空下乾燥する。ビス (アミノヘキシル) ポリエチレングリコールを前記例に記載されたようにしてマレイミド誘導体に反応させる。SPDP DNA トリエステルを 0.1 M 炭酸バッファー (pH 7.2) に溶解した 1.0 M のメルカプトエタノールで 1 時間処理する。この処理により 5'-チオビリド分が分離され、反応性スルフィドが形成する。過剰の還元剤は、末端 SH の再酸化を防ぐためすべての分画を真空下脱気した 0.1 M 炭酸バッファー、pH 6.8 内で行なうことを除いて前記のように G-25 カラムを用いて行なわれる。この方法において、マレイミジル化ポリエチレングリコールとその後の反応を防ぐため、すべての過剰の還元剤を除去することが重要である。

この方法において分離されたチオビリド分は、5'-末端 SH の存在を定量的に測定する簡便な間接的方法を提供する。還元によって分離されたチオビリド分は 343 nm において UV 吸収を有する。この波長における溶液の吸収の増加することにより、一連の還元が容易に追跡できる。次いで、8080 のモル消光係数を用いてチオビリド分を定量的に測定する。次いで粉末あるいは溶液として SH 末端オリゴマー トリエステルを含む溶液に加えることによって、生成物を 10 倍モル過剰のビス (SHCC-アミノヘキシル) ポリエチレングリコールと一晩反応させる。この反応を一晩 25℃で行なう。

次いで組合体の精製を行なう。1.0 mMのTris、pH 7.5で洗出するSephadex G-100またはTSK G4000SWのBPGFCによるゲル濾過によって、結合していないオリゴヌクレオチドを除去する。この方法の最終生成物の精製は下式で表わされる。

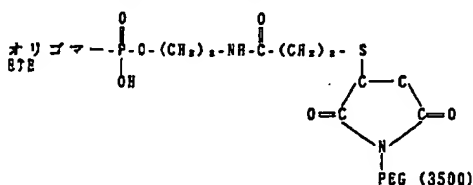


図 9

塩化トリエステル法を用いるDNAアルキル並びにアリールトリエステルのポリエーテル脱脂体の合成

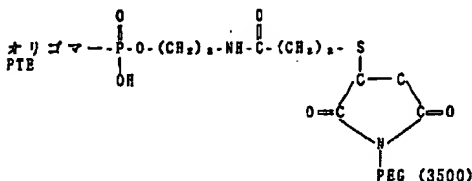
塩化トリエステル法を用いるアリール脱脂体のホスホトリエステルオリゴヌクレオチドの合成

可変アルカン鎖長を有する塩化トリエステルの最も有効な製造方法は、 α -クロロフェニルホスフェートトリエステル(PTE)として塩化トリエステルを合成する従来のホスフェートトリエステル化学による。合成の終了の際、合成支持体に結合した完全に保護されたオリゴヌクレオチドクロロフェニルトリエステルをテトラブチルアンモニウムフルオリドおよびアルコールの存在下エステル交換する。DNAオリゴヌクレオチド形成の基本的方法は古典的DNA合成化学である。GaitのOligonucleotide Synthesis: A Practical Approach, IRL

ら、*Can. J. Biochem.* (1975) 53:392~4; Miller ら、*Biochemistry* (1986) 25:5092~97)。

合成支持体に結合した完全にブロックされた物質をテトラブチルアンモニウムフルオリド(TBAF)およびアルコールの存在下無水条件下でエステル交換する。この方法により迅速なおよび定量的アルコール交換が生ずる。この方法は安定な生成物を形成できる大部分のアリール並びにアルキルアルコールに対し20分で終了する。

この例において、最終濃度0.2 MにTBAFを溶解するため無水エーテルを用いる。次いでこの溶液をゆっくりオリゴマクロフェニルトリエステルを含む樹脂上に注ぎ、約1時間室温で反応させる。次いでこの樹脂をメタノール並びにアセトニトリルで洗い、乾燥アルゴン流下で乾燥する。例8のようにアミン結合アーム添加、脱ブロック、および精製を行なう。ポリエチレングリコール結合を例7のようにして行なう。結合体の最終収率は、用いたヌクレオチド樹脂の約10%である。最終生成物の精製は下式で表わされる。



Press, Washington D.C. (1984) 参照。

DNA-あるいは α -クロロフェニルホスホトリエステルの化学合成は、Letsinger, Tanaka, *Nucl. Acids Res.* (1982) 25:3249~60のホスホクロリジンの改良法を用いて行なわれた。

無水アセトニトリル2, 6-ルチジンに溶解し、クロロフェノキシジクロロホスフィンによりその場で活性化された完全にブロックされたおよび乾燥したヌクレオチドを、前記例のスチレンスプレーにより制御細孔ガラス支持体に結合した成長しているDNA鎖の5'-ヒドロキシ末端ヌクレオチドに加える。乾燥ガラス支持体、完全にブロックされたヌクレオチドおよび他の合成試薬はApplied Biosystems (San Francisco, CA)またはAmerican Biochemical (Boehringer, CA)より市販入手可能である。ヌクレオチド添加に続き、無水酢酸による未反応5'-ヒドロキシのキャッピング、炭素添加、およびトリクロロ酢酸-塩化メチレン中での5'-脱トリチル化を行なう。

樹脂結合オリゴマクロフェニルトリエステルを無水アセトニトリル内で洗滌することにより乾燥し、この操作を繰り返す。この方法を用いる通常の周期は13分であり、その結合効率は92%以上である(トリチル放出により判断)。最後の塩基を β -シアノエチルホスホトリエステルとして加えると、塩基の開裂の際に5'-末端ホスホジエステルを生ずる。このステップはオリゴヌクレオチドの放射ラベルおよびゲル電気泳動を用いる生成物の精製を可能にする(Narong

例 10

インビトロで及び培養細胞中での β -グロビン蛋白質の合成に対するトリチル末端オリゴヌクレオチドの効果

前行する例において与えられた合成法を用いて、塩基タイプ及びエチルトリエステルタイプのオリゴヌクレオチドを作製した。分子の5'末端に酸性基を含有する両塩基性DNA接合体の最も簡単な例において、合成の終りにトリチル基を付した。このタイプの精製された物質を、ヘモグロビンを産生する様に誘導されたマウス赤血球細胞でのヘモグロビンの特異的発現の防止におけるそれらの有効性について試験した。これらの及び次の例において試験されたオリゴヌクレオチドを第1段に示す。

第 1 表

細胞培養実験において使用するために合成されたDNA配列

| マウスβ-グロブリン遺伝子に結合したオリゴヌクレオチド配列 | GC (%) | 配列 (3' → 5') |
|-------------------------------------|--------|--------------------------|
| MBG 15 アンチセンス | 60% | 5' TAC CAC GTG CAC TGA C |
| MBG 15 アンチセンス-DNT | 60% | 5' TAC CAC GTG CAC TGA C |
| MBG 15 アンチセンス-C ₁₀ -アミン | 60% | 5' TAC CAC GTG CAC TGA C |
| MBG 15 エチルトリエステル-DNT | 60% | 5' TAC CAC GTG CAC TGA C |
| MBG 20 アンチセンス | 55% | 5' TAC CAC GTG CAC TGA C |
| MBG 20 アンチセンス-C ₁₀ | 55% | 5' TAC CAC GTG CAC TGA C |
| MBG 20 アンチセンス-C ₁₀ -FITC | 55% | 5' TAC CAC GTG CAC TGA C |
| MBG 20 アンチセンス-C ₁₀ -FITC | 55% | 5' TAC CAC GTG CAC TGA C |
| MBG 20 アンチセンス-C ₁₀ -FITC | 55% | 5' TAC CAC GTG CAC TGA C |
| MBG 20 アンチセンス-C ₁₀ -FITC | 55% | 5' TAC CAC GTG CAC TGA C |
| MBG 20 アンチセンス-C ₁₀ -FITC | 55% | 5' TAC CAC GTG CAC TGA C |

a) 小文字は、遺伝子配列に結合したオリゴヌクレオチド配列を示す。DNTは、5'-末端アミノアルカンに結合したオリゴヌクレオチド配列を示す。C₁₀は、10-炭素アルカンに結合したオリゴヌクレオチド配列を示す。FITCは、フルオレセインに結合したオリゴヌクレオチド配列を示す。MBGは、マウスβ-グロブリン遺伝子に結合したオリゴヌクレオチド配列を示す。

第 2 表

マウス細胞におけるヘモグロビンの蓄積に対するトリチルオリゴマーの効果

| オリゴマー濃度 (mM) | 生存細胞 (%) (対照に対する%) | ベンジジン (%) (B ₅₀) | 阻害 (%) (B ₅₀ 細胞) |
|---------------------|--------------------|------------------------------|-----------------------------|
| DMSO 対照 | 100% | 100% | 0% |
| MBG 15 100mM | 100% | 68% | 32% |
| MBG 15 ETE 50mM | 95% | 59% | 41% |
| MBG 15 ETE-DNT 50mM | 94% | 43% | 57% |

(*) 第 1 表を参照のこと。ETE はエチルトリエステルである。

例 1.1

培養細胞におけるβ-グロブリン蛋白質の合成に対する異性アルキル末端オリゴヌクレオチドの効果

先行例において与えられた合成法を用いて、5'-末端アミノアルカンに結合した15~20塩基長のオリゴヌクレオチドを例 5 に記載したようにして作製した。このタイプの精製された物質を、ヘモグロビンを生産するように誘導された MEL 細胞でのヘモグロビンの特異的発現の阻害におけるそれらの有効性について試験した。この結果を第 3 表に示す。試験方法は例 1.0 に示した通りである。

第 3 表

培養細胞でのヘモグロビン合成の阻害におけるオリゴヌクレオチドの有効性に対する疎水性の増加の効果

| 処 理 | 生存細胞 (%) | ベンジジン (%) (細胞の阻害) |
|-----------------------------|----------|-------------------|
| DMSO 対照 | 46% | 0% |
| MBG-20 | 50% | 41% |
| アンチセンス 50mM | 50% | 41% |
| MBG-20-C ₁₀ 50mM | 61% | 48% |
| MBG-20-C ₁₀ 50mM | 62% | 66% |

(*) 第 1 表を参照のこと。

第 3 表に示すように、得られた結果が示すところによれば、アミノアルカン末端オリゴマーは、末端アルカンを欠くそれらの同族配列に比べて、選択的阻害の程度を生成する上で一層効果的である。例えば、C₁₀誘導体は、ヘモグロビン陽性細胞の数の減少において対照未修飾 20 マーに比べて約 60% 多く効果的であった。一般に、アルキル鎖が長くなるに従って、同じ程度 (%) の阻害を行うのに必要なオリゴマーの濃度は低くなる。

例 1.2

培養細胞におけるβ-グロブリン蛋白質の合成に対するフルオレセイン末端オリゴヌクレオチドの効果

例 1 に示した合成法を用いて、リンカーとしてエチレンジアミンを使用して 5'-末端フルオレセインに結合した 15~20 塩基長のオリゴヌクレオチドを作製した。細胞へのオリ

これらの実験のために選択された細胞は、DMSO 及び硫酸を含む種々の薬物によりヘモグロビンを合成するように誘導され得る Friend ネズミ赤血白血病 (MEL) 細胞である [Gusella 及び Houseman, Cell (1976) 8:263-269 を参照のこと]。MEL 細胞は CO₂ インキューベーター中での常用技法を用いる培養中に増殖する。

グロビンを発現する誘導された細胞は、ヘモグロビン産生細胞を青く染めるベンジジン処理により可視化され得る [Leder 等, Science (1975) 190:893]。細胞は、インキューベーション中 1 mg/2 ~ 1 mg/2 の範囲の濃度で、選択されたオリゴヌクレオチド複合体に暴露された。対照は模倣 (mock) 処理細胞及びランダム配列オリゴマー対照により処理された細胞を用いた。処理された細胞を染色強度に基くグロビン生産について種々の時間間隔においてスコアし、そして結果を対照と比較した。対照細胞の約 50% が誘導性である。毒性及び細胞損傷の標示を得るため、トリパンプル排除により、処理による細胞死及び損傷をスコアした。

得られた結果を第 2 表に示す。これらの結果は、トリチル末端オリゴマーが合成阻害の所望の程度を生成せしめるのに一層効果的であることを示している。しかしながら、トリチル末端オリゴマーは、療法剤としてのこれらの一般的使用を推奨しないある程度の細胞損傷を示した。

ゴマーの取り込みを蛍光顕微鏡によりモニターすることができ、このことが生成物による細胞死の他の証拠を提供する点において、この物質はさらなる利点を有する。精製された蛍光オリゴマーを、ヘモグロビンを生産するように誘導された MEL 細胞でのヘモグロビンの特異的発現の阻害におけるそれらの有効性について試験した。結果を第 4 表に示す。

この試験の方法は例 10 に示した通りである。

第 4 表

培養細胞でのヘモグロビン合成の阻害に対する FITC 複合体の効果

| オリゴマー ^(*) | 生存細胞 (%) | ベンジジン ^(*) 細胞の阻害 |
|------------------------------------|----------|----------------------------|
| DMSO 対照 | 53% | 0% |
| HBG-20 | | |
| アンチセンス 50 μM | 73% | 35% |
| HBG-20-C ₁₂ -FITC 50 μM | 68% | 45% |
| HBG-20-C ₁₂ -FITC 50 μM | 76% | 36% |
| HBG-20-C ₁₂ -FITC 50 μM | 72% | 52% |

^(*) 第 1 表を参照のこと。

第 4 表からわかるように、得られた結果が示すところによれば、フルオレッセイン末端オリゴマーは、ヘモグロビン合成の選択的阻害の生成において、FITC を欠くそれらの同族対照配列と少なくとも同等に効果的である。さらに、処理された細胞の蛍光顕微鏡観察は、フルオレセインが結合したオリゴマーの取り込みに基づく増強された蛍光を示した。次に、これらの細胞を単離し、生理的食塩水中で数回洗浄し、そして水中での数回の凍結・解凍により溶解せしめた。生ずる溶液

第 5 表

培養細胞でのヘモグロビン合成の阻害に対するポリエチレングリコール複合体の効果

| オリゴマー複合体 ^(*) | 生存細胞 (対照に対する%) | ベンジジン ^(*) 細胞の阻害 |
|-------------------------------|----------------|----------------------------|
| DMSO 対照 | 33% | 0% |
| HBG-15 | | |
| アンチセンス 100 μM | 50% | 25% |
| HBG-15-C ₁₂ 100 μM | 60% | 22% |
| PEG(ss) 100 μM | 43% | 24% |
| HBG-20+PEG(ss) 100 μM | 43% | 78% |
| DMSO 対照 | 65% | 0% |
| HBG-20-PEG(ss) 15 μM | 0% | 95% |
| 5 μM | 62% | 52% |
| 1 μM | nd | -2% |
| 0.1 μM | 64% | -5% |

^(*) 第 1 表を参照のこと。

第 5 表に示すように、得られた結果が示すところによれば、ポリエチレングリコールに結合したオリゴマーは所望の程度の選択的阻害の生成において、対照より効果的であった。この例におけるポリエチレングリコール複合体は、20 マー体とポリエチレングリコールとの対照組み合わせよりも約 10 倍活性が高いことが見出された。さらに、PEG 複合体について観察される増加した有効性と一致して、増地へのポリエチレングリコールの単なる添加が、添加された対照アンチセンスオリゴマーの有効性を増加せしめることに注目することは興味深い。

上記の結果から、本発明の新規な複合体が、転写機構を調節する効率の増強において実質的な利点を提供することが明

を達心して細胞破片を除去し、そして存在するフルオレッセイン結合オリゴマーの量をアミンコ (Aminco) 蛍光分光計で定量化した。得られた結果が示すところによれば、処理された細胞は細胞当たり平均 10⁴ 分子のフルオレッセイン結合オリゴマーを同化した。これは、類似の DNA オリゴマー（すなわち溶解性成分を欠く）の細胞当たり約 10⁴ 分子の細胞取り込みに比べて約 10 倍高い。

従って、オリゴマーへの疎水性成分（この場合フルオレッセイン）の付加が、蛋白質合成を選択的にブロックするその能力に影響を与えることなくオリゴマーの細胞取り込みの実質的増加をもたらすことがわかる。

例 13

培養細胞での β-グロビン蛋白質の合成に対するポリエチレングリコール末端オリゴヌクレオチドの効果

先行例に示した合成法を用いて、5'-末端ポリエチレングリコールに結合した 20 塩基長のオリゴヌクレオチドを、例 4 に記載したようにして作製した。これらの分子複合体を精製し、そして例 10 に記載したようにヘモグロビンの特異的発現の阻害におけるそれらの有効性について試験した。

らかである。この発明に従えば、広範な種類の細胞性（原核性及び真核性の両方）、並びにウイルス性の、生理的過程が制御され得る。この組成物はインビトロ及びインビボで使用することができる。前者においては、哺乳類のマイクプラズマからの保種、表現型の変更等の機構を研究することができる。後者においては、病原体の増殖阻害、ある種の細胞、例えば B-細胞及び T-細胞の選択的阻害等における療法のために組成物を使用することができる。

この明細書に記載したすべての刊行物及び特許出願はこの発明が属する分野における通常の知識を有するものの技術水準を示すものである。すべての刊行物及び特許出願は、各それぞれの刊行物又は特許出願が引用により組み込まれるべきことが特定して且つ個別的に示されていたのと同様に、引用によりこの明細書に組み込まれる。

前記の発明は理解を明瞭にするために説明により及び例示により幾分詳細に記載されたが添付された詳細の範囲の範囲内において幾かの変換及び変更が行われ得ることは自明であろう。

手続補正書(方式)

平成²年¹¹月⁶日

特許庁長官 吉田 文 毅 殿

1. 事件の表示

PCT/US88/02009

2. 発明の名称

新規な両親媒性核酸換合体

3. 補正をする者

事件との関係 特許出願人

名称 シンセティック ジェネティクス

4. 代理人

住所 〒105 東京都港区虎ノ門一丁目8番10号

野光虎ノ門ビル 電話 504-0721

氏名 弁理士 (8579) 青 木 朗 (外4名)

5. 補正命令の日付

平成1年11月7日(発送日)



国際調査報告

| International Application No. PCT/US88/02009 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|-------------------------|---|-------------------------|---|--|------|---|---|------|---|---|------|---|---|------|---|--|------|
| 1. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER of source classification symbols only, include all: Appropriate to International Patent Classification (IPC) or to one of the following: IPC(4): C12N 5/00; C12N 5/03, C12P 19/34 U.S. 435/242, 435/21 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 2. FIELD OF SEARCH | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Classification System | Classification Symbols | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| US | 435/6, 91, 243 530/358 | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 3. DOCUMENTS RELEVANT TO THE INVENTION Documents identified after the International Search procedure to the extent that such documents are included in the Field of Search: Chemical Abstracts Data Base (CAS) 1967-1988 Keywords: amphiphilic, nucleic acid | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| 4. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT: <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category</th> <th>Group of Documents: If not indicated, unless specifically, at the relevant passages</th> <th>Relevant to Claim No. 1</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>U.S. A. 4,787,441, 12 July 1988, (FUNG ET AL.), see column 1, lines 8-31, and column 2, lines 40-63.</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>U.S. A. 4,511,713, 16 April 1985, (MILLER ET AL.), see column 2, lines 13-68, and column 3, lines 1-48.</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>U.S. A. 4,587,044 6 May 1986, (MILLER ET AL.), see column 1, line 25 - column 3, line 60.</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>FR 2,556,726 21 June 1985 (CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY), page 3, line 23 - page 5, line 4.</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>GB, 2,151,256 A, 21 August 1985, (CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY), see page 1, line 125 - page 2, line 47.</td> <td>1-19</td> </tr> </tbody> </table> | | Category | Group of Documents: If not indicated, unless specifically, at the relevant passages | Relevant to Claim No. 1 | X | U.S. A. 4,787,441, 12 July 1988, (FUNG ET AL.), see column 1, lines 8-31, and column 2, lines 40-63. | 1-19 | Y | U.S. A. 4,511,713, 16 April 1985, (MILLER ET AL.), see column 2, lines 13-68, and column 3, lines 1-48. | 1-19 | Y | U.S. A. 4,587,044 6 May 1986, (MILLER ET AL.), see column 1, line 25 - column 3, line 60. | 1-19 | Y | FR 2,556,726 21 June 1985 (CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY), page 3, line 23 - page 5, line 4. | 1-19 | Y | GB, 2,151,256 A, 21 August 1985, (CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY), see page 1, line 125 - page 2, line 47. | 1-19 |
| Category | Group of Documents: If not indicated, unless specifically, at the relevant passages | Relevant to Claim No. 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| X | U.S. A. 4,787,441, 12 July 1988, (FUNG ET AL.), see column 1, lines 8-31, and column 2, lines 40-63. | 1-19 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | U.S. A. 4,511,713, 16 April 1985, (MILLER ET AL.), see column 2, lines 13-68, and column 3, lines 1-48. | 1-19 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | U.S. A. 4,587,044 6 May 1986, (MILLER ET AL.), see column 1, line 25 - column 3, line 60. | 1-19 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | FR 2,556,726 21 June 1985 (CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY), page 3, line 23 - page 5, line 4. | 1-19 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | GB, 2,151,256 A, 21 August 1985, (CALIFORNIA INSTITUTE OF TECHNOLOGY), see page 1, line 125 - page 2, line 47. | 1-19 | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| * Special categories of cited documents: "A" document published in a foreign state of the art which is not available to the public "B" document published on or after the international filing date "C" document which may have priority or priority rights or which is a document of a foreign state of the art which is not available to the public "D" document published in a foreign state of the art which is not available to the public "E" document published in a foreign state of the art which is not available to the public "F" document published in a foreign state of the art which is not available to the public "G" document published in a foreign state of the art which is not available to the public "H" document published in a foreign state of the art which is not available to the public "I" document published in a foreign state of the art which is not available to the public "J" document published in a foreign state of the art which is not available to the public "K" document published in a foreign state of the art which is not available to the public "L" document published in a foreign state of the art which is not available to the public "M" document published in a foreign state of the art which is not available to the public "N" document published in a foreign state of the art which is not available to the public "O" document published in a foreign state of the art which is not available to the public "P" document published in a foreign state of the art which is not available to the public "Q" document published in a foreign state of the art which is not available to the public "R" document published in a foreign state of the art which is not available to the public "S" document published in a foreign state of the art which is not available to the public "T" document published in a foreign state of the art which is not available to the public "U" document published in a foreign state of the art which is not available to the public "V" document published in a foreign state of the art which is not available to the public "W" document published in a foreign state of the art which is not available to the public "X" document published in a foreign state of the art which is not available to the public "Y" document published in a foreign state of the art which is not available to the public "Z" document published in a foreign state of the art which is not available to the public | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| IV. CERTIFICATION Date of the Actual Completion of the International Search: 13 September 1988 Date of Mailing of the International Search Report: 08 NOV 1988 International Searching Authority: STEPHANIE SELDMAN, Ph.D., J.D. | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

8. 補正の対象

- (1) 特許法第 184条の 5 第 1 項の規定による書面の「特許出願人の代表者」の欄
- (2) 明細書及び請求の範囲の翻訳文
- (3) 委任状
- (4) 法人証明書

7. 補正の内容

- (1)(3)(4) 別紙の通り
- (2) 明細書、請求の範囲の翻訳文の淨書(内容に変更なし)

8. 添付書類の目録

- (1) 訂正した特許法第 184条の 5 第 1 項の規定による書面 1 通
- (2) 明細書及び請求の範囲の翻訳文 各 1 通
- (3) 委任状及びその翻訳文 各 1 通
- (4) 法人証明書及びその翻訳文 各 1 通

| International Application No. PCT/US88/02009 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|---|--|-------------------------|---|-------------------------|---|--|------|---|---|------|---|--|------|---|---|------|---|--|------|---|---|------|---|--|------|
| 5. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET) <table border="1"> <thead> <tr> <th>Category</th> <th>Group of Documents: If not indicated, unless specifically, at the relevant passages</th> <th>Relevant to Claim No. 1</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Y</td> <td>NUCLEIC ACIDS RESEARCH, (Oxford, England), Volume 13, Number 7, issued 11 April 1985, (SMITH ET AL.), "Synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus; synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis", see abstract.</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>BIOCHEMISTRY, (Easton, Pennsylvania, U.S.A.), Volume 24, Number 22, issued 22 October 1985, (BLAKE ET AL.), "Inhibition of Rabbit Globin mRNA Translation by Sequence-Specific Oligodeoxyribonucleotides", see pages 6133-6135.</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>BIOCHEMISTRY, (Easton, Pennsylvania, U.S.A.), Volume 13, Number 24, issued 19 November 1974, (BARRETT ET AL.), "Inhibitory Effect of Complex Formation with Oligodeoxyribonucleotide Ethyl Phosphotriesters on Transfer Ribonucleic Acid Aminoacylation", see page 4897.</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>NUCLEIC ACIDS RESEARCH, (Oxford, England), Volume 13, Number 5, issued March 1985, (CHOLLET ET AL.), "Biotin-labeled synthetic oligodeoxyribonucleotides: chemical synthesis and use as hybridization probes", see page 1529.</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>NUCLEIC ACIDS RESEARCH, (Oxford, England), Volume 13, Number 12, issued June 1985, (CONNOLLY), "Chemical synthesis of oligonucleotides containing a free sulphhydryl group and subsequent attachment to thiol specific probes", see page 4485.</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>NUCLEIC ACIDS RESEARCH, (Oxford, England), Volume 11, Number 19, issued September 1983, (CEU ET AL.), "Derivatization of unprotected polynucleotides", see page 6513.</td> <td>1-19</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>SCIENCE, (Washington, D.C., U.S.A.), Volume 230, issued 18 October 1985, (CARUTHERS), "Gene Synthesis Machines: DNA Chemistry and its Uses", see page 281.</td> <td>1-19</td> </tr> </tbody> </table> | | Category | Group of Documents: If not indicated, unless specifically, at the relevant passages | Relevant to Claim No. 1 | Y | NUCLEIC ACIDS RESEARCH, (Oxford, England), Volume 13, Number 7, issued 11 April 1985, (SMITH ET AL.), "Synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus; synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis", see abstract. | 1-19 | Y | BIOCHEMISTRY, (Easton, Pennsylvania, U.S.A.), Volume 24, Number 22, issued 22 October 1985, (BLAKE ET AL.), "Inhibition of Rabbit Globin mRNA Translation by Sequence-Specific Oligodeoxyribonucleotides", see pages 6133-6135. | 1-19 | Y | BIOCHEMISTRY, (Easton, Pennsylvania, U.S.A.), Volume 13, Number 24, issued 19 November 1974, (BARRETT ET AL.), "Inhibitory Effect of Complex Formation with Oligodeoxyribonucleotide Ethyl Phosphotriesters on Transfer Ribonucleic Acid Aminoacylation", see page 4897. | 1-19 | Y | NUCLEIC ACIDS RESEARCH, (Oxford, England), Volume 13, Number 5, issued March 1985, (CHOLLET ET AL.), "Biotin-labeled synthetic oligodeoxyribonucleotides: chemical synthesis and use as hybridization probes", see page 1529. | 1-19 | Y | NUCLEIC ACIDS RESEARCH, (Oxford, England), Volume 13, Number 12, issued June 1985, (CONNOLLY), "Chemical synthesis of oligonucleotides containing a free sulphhydryl group and subsequent attachment to thiol specific probes", see page 4485. | 1-19 | Y | NUCLEIC ACIDS RESEARCH, (Oxford, England), Volume 11, Number 19, issued September 1983, (CEU ET AL.), "Derivatization of unprotected polynucleotides", see page 6513. | 1-19 | Y | SCIENCE, (Washington, D.C., U.S.A.), Volume 230, issued 18 October 1985, (CARUTHERS), "Gene Synthesis Machines: DNA Chemistry and its Uses", see page 281. | 1-19 |
| Category | Group of Documents: If not indicated, unless specifically, at the relevant passages | Relevant to Claim No. 1 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | NUCLEIC ACIDS RESEARCH, (Oxford, England), Volume 13, Number 7, issued 11 April 1985, (SMITH ET AL.), "Synthesis of oligonucleotides containing an aliphatic amino group at the 5' terminus; synthesis of fluorescent DNA primers for use in DNA sequence analysis", see abstract. | 1-19 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | BIOCHEMISTRY, (Easton, Pennsylvania, U.S.A.), Volume 24, Number 22, issued 22 October 1985, (BLAKE ET AL.), "Inhibition of Rabbit Globin mRNA Translation by Sequence-Specific Oligodeoxyribonucleotides", see pages 6133-6135. | 1-19 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | BIOCHEMISTRY, (Easton, Pennsylvania, U.S.A.), Volume 13, Number 24, issued 19 November 1974, (BARRETT ET AL.), "Inhibitory Effect of Complex Formation with Oligodeoxyribonucleotide Ethyl Phosphotriesters on Transfer Ribonucleic Acid Aminoacylation", see page 4897. | 1-19 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | NUCLEIC ACIDS RESEARCH, (Oxford, England), Volume 13, Number 5, issued March 1985, (CHOLLET ET AL.), "Biotin-labeled synthetic oligodeoxyribonucleotides: chemical synthesis and use as hybridization probes", see page 1529. | 1-19 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | NUCLEIC ACIDS RESEARCH, (Oxford, England), Volume 13, Number 12, issued June 1985, (CONNOLLY), "Chemical synthesis of oligonucleotides containing a free sulphhydryl group and subsequent attachment to thiol specific probes", see page 4485. | 1-19 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | NUCLEIC ACIDS RESEARCH, (Oxford, England), Volume 11, Number 19, issued September 1983, (CEU ET AL.), "Derivatization of unprotected polynucleotides", see page 6513. | 1-19 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Y | SCIENCE, (Washington, D.C., U.S.A.), Volume 230, issued 18 October 1985, (CARUTHERS), "Gene Synthesis Machines: DNA Chemistry and its Uses", see page 281. | 1-19 | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |

第1頁の続き

| ⑤Int. Cl. ⁹ | 識別記号 | 庁内整理番号 |
|------------------------|------|---------|
| A 61 K 31/70 | ABC | |
| | ADU | 7431-4C |
| 31/76 | AEB | |
| | ADY | |
| | ADZ | |
| C 12 N 5/10 | | |
| 15/87 | ZNA | |
| // A 61 K 48/00 | | 8615-4C |